

УДК 57.086.13:534.8:61846-085.451.16

С.Л. Розанова*, Є.І. Науменко, Е.О. Нардід

Вплив низькотемпературного зберігання та обробки ультразвуком плаценти на антиоксидантні властивості її екстрактів

UDC 57.086.13:534.8:61846-085.451.16

S.L. Rozanova*, Ye.I. Naumenko, E.O. Nardid

Influence of Low Temperature Storage and Ultrasonic Treatment of Placenta on Its Extracts Antioxidant Properties

Реферат: Представлено експериментальні дані щодо оцінки впливу низькотемпературного зберігання плаценти та способу отримання екстрактів плаценти людини (ЕПЛ) на їх антиоксидантні властивості, які визначали за здатністю відновлювати тривалентне залізо та ABTS⁺-радикал, хелатувати іони заліза, а також за вмістом фенольних сполук, величиною активності каталази та супероксиддисмутази. Показано, що зберігання плацент при -196°C протягом 6 місяців не впливало на антиоксидантні властивості одержаних із них екстрактів. Встановлено, що застосування ультразвукових коливань при отриманні ЕПЛ не тільки скорочує строк екстракції, але й є ефективним фактором збереження їх антиоксидантних властивостей.

Ключові слова: криоконсервування, екстракт плаценти людини, антиоксидантні властивості, ультразвук.

Реферат: Представлены экспериментальные данные по оценке влияния низкотемпературного хранения плаценты и способа получения экстрактов плаценты человека (ЭПЧ) на их антиоксидантные свойства, которые оценивали по способности восстанавливать трехвалентное железо и ABTS⁺-радикал, хелатировать ионы железа, а также по содержанию фенольных соединений, величине активности каталазы и супероксиддисмутази. Показано, что хранение плацент при -196°C в течение 6 месяцев не влияло на антиоксидантные свойства получаемых из них экстрактов. Установлено, что применение ультразвуковых колебаний при получении ЭПЧ не только сокращает срок экстракции, но и является эффективным фактором для сохранения их антиоксидантных свойств.

Ключевые слова: криоконсервирование, экстракт плаценты человека, антиоксидантные свойства, ультразвук.

Abstract: The experimental data concerning evaluation of low temperature storage and ways of placenta extract obtaining influences on human placenta extract (HPE) antioxidant properties are provided. HPE antioxidant properties were estimated by capacity to reduce the ferric iron and ABTS⁺ radical, to chelate ferrous ions, by phenolic compound content and the value of catalase and superoxid dismutase activity. Six-month placenta storage at -196°C has been shown not to affect HPE antioxidant activity. Moreover ultrasonic wave's application during obtaining of HPE either decreases the time of extraction or is effective factor of extracts' antioxidant properties preservation.

Key words: cryopreservation, human placenta extract, antioxidant properties, ultrasound.

Відомо, що плацента людини, а також отримані з неї препарати мають різноманітні терапевтичні властивості [15, 21]. Це пояснюється присутністю у ній біологічно активних речовин, які характеризуються антиоксидантними властивостями та здатні нейтралізувати активні форми кисню, що сприяють розвитку багатьох захворювань. Плацента містить два види антиоксидантів: ферментативні (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидази) та неферментативні (хелатні протеїни, тіоли, амінокислоти, фенольні сполуки, сечова кислота, вітаміни, деякі гормони (естроген та мелатонін)) [17, 27, 30].

Встановлено, що екстракти плаценти людини (ЕПЛ) здатні нейтралізувати гідроксильний

Human placenta and its preparations are known to possess various therapeutic activities [15, 21]. This fact is explained by the presence of bioactive substances with antioxidant properties and their ability to neutralize active oxygen species which are a contributing factor in development of various diseases. Placenta contains two kinds of antioxidants: enzymatic (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) and nonenzymatic (chelating proteins, thiols, amino acids, phenolic compounds, uric acid, vitamins and certain hormones (estrogen and melatonin)) [17, 27, 30].

Human placenta extracts (HPEs) have been shown to scavenge hydroxyl radical, nitric oxide, superoxide radical; to reduce ferric iron; to chelate transition metal ions and to prevent lipid peroxidation [27, 30]. These

Відділ кріобіофізики, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: sv.rosanova@gmail.com

Надійшла 10.02.2015
Прийнята до друку 14.05.2015

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2015. – Т. 25, №3. – С. 255–266.
© 2015 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Department of Cryobiophysics, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: sv.rosanova@gmail.com

Received February, 10, 2015
Accepted May, 14, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25 (3): 255–266.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

радикал, окис азоту, супероксидний радикал; відновлювати тривалентне залізо; хелатувати іони металів змінної валентності та запобігати перекисному окисненню ліпідів [27, 30]. Завдяки такому складу ЕПЛ можуть застосовуватися для лікування хвороб, які виникли внаслідок оксидативного стресу.

Основною перешкодою для більш широкого використання препаратів плаценти у клінічній практиці є нетривалий строк їх зберігання у функціонально повноцінному стані, тому досить складно провести тестування на їх бактеріальне та вірусне зараження. Подовження строків зберігання та розширення сфери використання препаратів плаценти у клінічній практиці можливе завдяки сучасним кріобіологічним технологіям [3]. Проте було показано, що зберігання біологічних об'єктів у замороженому стані також може негативно впливати на властивості та активність речовин, які входять до складу ЕПЛ, головним чином внаслідок конформаційних змін макромолекул [13, 18].

Відомо, що використання ультразвуку дозволяє значно прискорити процес екстракції, збільшити вихід речовини, яка екстрагується, знизити собівартість препаратів плаценти та підвищити продуктивність праці [1]. Крім того, ультразвук проявляє ефект стерилізації, що зберігається деякий час після обробки розчину, емульсії і т. п. [4]. Однак відомо, що ультразвукова обробка, залежно від потужності та часу може призводити до зміни активності внаслідок розщеплення високомолекулярних сполук, впливу на структуру та функції протеїнів і нуклеїнових кислот, глікозилювання білків та накопичення вільних радикалів [2, 14, 29].

Метою даної роботи було вивчення антиоксидантних властивостей екстрактів, отриманих шляхом застосування ультразвукових коливань зі свіжоотриманої та кріоконсервованої плаценти, а також дослідження активності окремих фракцій ЕПЛ.

Матеріали та методи

У роботі досліджували плаценти масою 400–600 г (строк гестації 40 тижнів, $n = 10$), які були одержані за інформованої згодою від породілей після тестування на наявність вірусних інфекцій (ВІЛ, гепатиту В, С) та збудника сифілісу. Зразки плацент зберігали не більше 24 годин при 4°C. Кожну плаценту розділяли на дві однакові частини: з однієї (свіжоотриманої плаценти) одразу одержували екстракти, а другу заморожували у пластикових пакетах до –196°C (у рідкому азоті) зі швидкістю 300 град/хв і зберігали протягом 6 місяців. Відігрів здійснювали на водяній бані при 37°C.

Для приготування екстрактів свіжоотриману або кріоконсервовану плаценту ретельно відмивали від слизу та крові ізотонічним розчином NaCl, який

facts may contribute to HPE application in clinical practice in order to treat various oxidation-induced diseases.

The main restriction of widening placenta application in clinical practice is a short term of its storage in functionally valid state, *i. e.* the testing for bacterial and viral contamination is complicated. Extending of placenta storage period and widening perspectives of its clinical usage is possible due to modern cryobiological techniques [9]. However, storage of biological objects in a frozen state may also affect the properties and biological activity of HPE compounds, mainly due to macromolecule conformational changes [13, 18].

Ultrasound application allows accelerating the extraction, increasing recovery of a substance, to be extracted, lowering placenta preparations cost and enhancing labor productivity [1]. Moreover, ultrasound is able to provide the sterilization effect, which is kept after treatment of solution, emulsion, *etc.* for some time [12]. However, ultrasound treatment, depending on power and time, could lead to activity alterations due to high molecular mass substances degradation, influence on protein and nucleic acids structure and functions, protein glycosilation and free radical accumulation [6, 14, 29].

The aim of the present research was both to study antioxidant properties of extracts obtained from fresh and cryopreserved placenta using ultrasonic waves and to investigate activity of individual HPE fractions.

Materials and methods

Human placentas weighing between 400–600 g (40 weeks of gestation ($n = 10$)) were collected from healthy parturients with their informed consent and tested for viral (HIV, hepatitis B, C) and syphilis contamination. Placentas were stored not longer than 24 hrs at 4°C. Each placenta was cut into two equal parts: the first one ('fresh') from which the extract was obtained immediately; the second one was frozen in plastic bag down to –196°C (in a liquid nitrogen) with the rate of 300 deg/min and stored during 6 months. Thawing was carried out in a water bath at 37°C.

For preparing the extracts either fresh or cryopreserved placenta was thoroughly washed from mucus and blood with NaCl isotonic solution which was substituted several times. The amniotic and chorion membranes were removed from the washed placenta, then it was minced into 3×2 cm pieces. Obtained placenta fragments were plunged into a vessel with physiological solution in 1:5 w/v ratio and stirred for 2–3 min. The upper layer was removed and the fresh portion of physiological solution was added, the procedure was performed 3–4 times. Washed placenta pieces were diluted with physiological solution in 1:1 w/v ratio and homogenized for 3 min using a high-



декілька разів змінювали. З відмитої плаценти ножицями відділяли амніотичну та хоріальну оболонки, після чого її подрібнювали на фрагменти 3×2 см, які занурювали у посудину з фізіологічним розчином у співвідношенні плаценти і розчину 1:5, та перемішували 2–3 хв. Надосад зливали і доливали свіжу порцію фізіологічного розчину, процедуру повторювали 3–4 рази. До відмитих шматочків плаценти додавали фізіологічний розчин у об'ємному співвідношенні 1:1 та гомогенізували на високошвидкісному гомогенізаторі РТ-1 У4.2 («Одеський експериментальний завод лабораторної медичної техніки», Україна) протягом 3 хв. Отриманий гомогенат ділили на дві частини: першу – витримували 12 годин при 4°C, другу – піддавали дії ультразвукових хвиль у диспергаторі УЗДН-1-У4.2 (Україна). Для отримання екстрактів шляхом застосування ультразвуку було підібрано оптимальний режим обробки гомогенату плаценти (4 хв при частоті 22 кГц), який забезпечував найбільш ефективне вивільнення антиоксидантних молекул та не призводив до їх денатурації. Щоб уникнути нагріву гомогенату озвучування здійснювали два рази по 2 хв із перервою 1 хв. Далі центрифугували при 1500g протягом 25 хв. Надосадову рідину надбирали і пропускали через мембранний фільтр 0,45 мкм («Millipore Corp. Carrigtwohill», Ірландія). Фільтрат, який є водно-сольовим екстрактом плаценти, розливали у пробірки для подальших експериментів.

У роботі досліджували наступні зразки екстрактів плаценти людини, які були отримані: 1 – зі свіжої плаценти шляхом 12-годинної експозиції з фізіологічним розчином (ЕПЛ_{св}), ($n = 10$); 2 – із кріоконсервованої плаценти шляхом 12-годинної експозиції з фізіологічним розчином (ЕПЛ_{кр}), ($n = 10$); 3 – зі свіжої плаценти, яку піддавали дії ультразвукових коливань (ЕПЛ_{св+уз}), ($n = 10$); 4 – із кріоконсервованої плаценти, яку піддавали дії ультразвукових коливань (ЕПЛ_{кр+уз}), ($n = 10$).

Окремі фракції екстрактів (об'єм кожної 3 мл) одержували методом гель-хроматографії з використанням сефадексу G-100 («Loba Feinchemie», Австрія) на колонці 21×2 см («Sigma Chemical Company», Німеччина). Для калібрування колонки використовували декстран блакитний із м.м. 2000 кДа («Sigma-Aldrich Chemical», США), бичий сироватковий альбумін з м.м. 66 кДа («Sigma-Aldrich Chemical»), цитохром С із м.м. 12 кДа («Sigma-Aldrich Chemical»).

Вміст білка в ЕПЛ та їх окремих фракціях визначали прямим спектрофотометричним методом за поглинанням при довжині хвилі 260 та 280 нм [11]. Усі спектрофотометричні дослідження здійснювали на спектрофотометрі «Pye Unicam SP 8000» (Велика Британія).

speed homogenizer RT-1 U4.2 (Odessa Experimental Factory of Laboratory Medical Equipment, Ukraine). The obtained homogenate was divided into two parts: the first one was exposed in physiological solution for 12 hrs at 4°C; the second one was treated with ultrasonic waves using ultrasonic disperser USDN-1-U4.2 (Ukraine). In order to obtain the extracts using ultrasound the optimal regimen of placenta homogenate treatment was chosen (4 min with 22 kHz). Such a regimen provided the most effective extraction of antioxidant molecules and did not lead to their denaturation. To avoid the homogenate heating the treatment was carried out 2 times during 2 min with the 1 minute interval. Then it was centrifuged at 1500g during 25 min. The supernatant was filtrated through a 0.45 μm membrane filter (Millipore Corp. Carrigtwohill, Ireland). Filtrate, which was an aqueous-saline placenta extract, was poured into tubes for further experiments.

In the work the following samples of human placenta extracts were assayed: 1 – obtained from fresh placenta by 12 hrs exposure with physiological solution (HPE_f), ($n = 10$); 2 – obtained from cryopreserved placenta by 12 hrs exposure with physiological solution (HPE_c), ($n = 10$); 3 – obtained from fresh placenta after ultrasound treatment (HPE_{f+us}), ($n = 10$); 4 – obtained from cryopreserved placenta after ultrasound treatment (HPE_{c+us}), ($n = 10$).

Individual fractions of extracts (3 ml) were obtained using gel-chromatography method with 27×1 cm column (Sigma Chemical Company, Germany) with Sephadex G-100 (Loba Feinchemie, Austria). Blue dextran with m.m. 2000 kDa (Sigma-Aldrich Chemical, USA), bovine serum albumin with m.m. 66 kDa (Sigma-Aldrich Chemical) and cytochrome C with m.m. 12 kDa (Sigma-Aldrich Chemical) were used in order to calibrate the column.

Content of proteins in extracts and individual fractions was measured using direct spectrophotometry by means of recording absorbance at 260 and 280 nm [9]. All spectrophotometric measurements were carried out using Pye Unicam SP8000 (UK).

To evaluate total phenolic content the experimental sample (0.1 ml) was mixed with 1.5 mL of Folin reagent (Sigma-Aldrich Chemical) previously diluted with a distilled water in 10 times [28]. The obtained mixture was hold for 5 min at 22°C and then sodium carbonate (1.2 mL, 7.5%) (Merk, Germany) was added. After 30 min incubation at 22°C the absorbance at 725 nm was recorded. Gallic acid (Sigma-Aldrich Chemical) was used as a control.

The reducing capacity of extracts and their fractions was assessed by ability to deoxidize the ferric-ferricyanide complex to the ferrous-ferricyanide complex of Prussian blue [20]. For this purpose, 0.2 mL of the experimental sample was mixed with phosphate buffer



Для оцінки загального вмісту фенолів у окремому зразку досліджуваній зразок (0,1 мл) змішували з 1,5 мл реагенту Фоліна («Sigma-Aldrich Chemical»), який був попередньо розведений у 10 разів дистильованою водою [28]. Отриману суміш витримували 5 хв при температурі 22°C, потім додавали розчин Na_2CO_3 (1,2 мл, 7,5%) («Merck», Німеччина). Після 30-хвилинної інкубації за 22°C виміряли поглинання при довжині хвилі 725 нм. Як контроль використовували галову кислоту («Sigma-Aldrich Chemical»).

Відновлювальну активність екстрактів, а також їх фракцій оцінювали за здатністю деоксигенувати залізо-фериціанідний комплекс берлінської лазури [20]. Для цього 0,2 мл зразка змішували з Na-фосфатним буфером (0,5 мл; 0,2 M; pH 6,6) і фериціанідом калію (0,5 мл; 1%) («Sigma-Aldrich Chemical»). Отриману суміш витримували при 50°C впродовж 20 хв, потім до суміші додавали 0,5 мл трихлороцтової кислоти (30%) і фільтрували. До 0,5 мл отриманого фільтрату додавали 0,1 мл 0,1% FeCl_3 («Merck», Німеччина). Збільшення поглинання реакційної суміші на довжині хвилі 700 нм свідчило про підвищення здатності зразків відновлювати тривалентне залізо ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). Стандартом була обрана аскорбінова кислота («Sigma-Aldrich Chemical»).

Антирадикальну активність зразків оцінювали спектрофотометричним методом за знебарвленням ABTS^+ -радикала [22], який отримували шляхом реакції між 7 мМ ABTS (2,2'-азинобис-(3-етилбензотіазоліно-6-сульфонік кислота)) («Sigma-Aldrich Chemical») в H_2O та 2,45 мМ персульфатом амонію (Sigma-Aldrich Chemical), після їх 12-годинної витримки у темряві за кімнатної температури. Перед застосуванням розчин ABTS^+ -радикала розводили дистильованою водою для отримання поглинання $0,700 \pm 0,025$ при 734 нм. Досліджувані зразки (0,1 мл) додавали до отриманого розчину (3 мл) і при довжині хвилі 734 нм реєстрували кінетику знебарвлення розчину ABTS^+ -радикала, яка має швидку і повільну фази [12]. Активність швидковідновлювальних центрів визначали за рівнем зменшення поглинання, яке спостерігалось впродовж перших 10 с, активність повільновідновлювальних центрів оцінювали за зниженням інтенсивності забарвлення у наступні 390 с.

Антирадикальну активність розраховували за формулою: $\text{ARA} = (A_0 - A)/A_0 \times 100\%$, де A_0 – інтенсивність поглинання на початку експерименту; A – інтенсивність поглинання через певний інтервал часу.

Хелатування ЕПЛ іонів заліза (Fe^{2+}) оцінювали за допомогою реагенту Феррозину [6]. До 0,2 мл досліджуваного зразка додавали розчин 2 мМ FeCl_2 («Merck») (0,05 мл). Реакцію ініціювали додаванням 5 мМ феррозину («Sigma-Aldrich

(0.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide (0.5 mL, 1%) (Sigma-Aldrich Chemical). The mixture was incubated at 50°C for 20 min then the aliquots (0.5 ml) of trichloroacetic acid (30%) were added to the mixture and the filtration was carried out. FeCl_3 (0.1 ml, 0.1%) (Merck, Germany) was added to the filtrate (0.5 ml). Increased absorbance of the reaction mixture at 700 nm indicates an increased sample capability to reduce ferric iron ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). L-ascorbic acid was used as a standard (Sigma-Aldrich Chemical).

Antiradical activity of samples was spectrophotometrically assessed when analyzing decolorization of ABTS^+ cation radical [22], which was produced by the reaction between 7 mM ABTS^+ (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma-Aldrich Chemical) in H_2O and 2.45 mM ammonium persulfate (Sigma-Aldrich Chemical), stored for 12 hrs in the darkness at room temperature. Before usage, the ABTS^+ solution was diluted with a distilled water to get an absorbance of 0.700 ± 0.025 at 734 nm. Experimental sample (0.1 ml) was added to the obtained solution (3 ml) and the kinetics of ABTS^+ radical decolorization, having two phases, was recorded at 734 nm. Results were presented as percentage changes in absorbance of initial ABTS^+ solution [11]. The activity of rapid reducing centers was evaluated by absorbance lowering during first 10 sec, activity of slow reducing centers was estimated by decay during next 390 sec.

Antiradical activity was calculated using formula: $\text{ARA} = (A_0 - A)/A_0 \times 100\%$, where A_0 was absorbance at the beginning of the experiment; A – absorbance after certain time period.

Ferrous ion (Fe^{2+}) chelation by HPE was estimated by the Ferrozine assay [3]. Experimental sample (0.2 ml) was mixed with a solution of 2 mM FeCl_2 (0.05 ml) (Merck). The reaction was initiated by the addition of 5 mM Ferrozine (0.2 mL) (Sigma-Aldrich Chemical, Germany). Then, the mixture was shaken vigorously and left for 10–15 min at room temperature. Then the sample absorbance was measured spectrophotometrically at 562 nm. The results were expressed as the percentage of inhibition of the Ferrozine- Fe^{2+} complex formation.

Superoxide dismutase (SOD) activity in HPE was determined by the enzyme ability to inhibit the reaction of epinephrine autooxidation in alkaline medium [18]. Reaction rate was assessed spectrophotometrically by the optical density value of product accumulated during epinephrine autooxidation in the presence of examined sample at 347 nm against the control.

The HPE ability to neutralize hydrogen peroxide was assessed by reaction of H_2O_2 with ammonium molybdate with the stable stained complex formation. The reaction was initiated by mixing the sample (0.1 ml) with hydrogen peroxide solution (2 ml, 0.03%) and



Chemical»). Суміш струшували і залишали за кімнатної температури на 10–15 хв. Після цього спектрофотометрично вимірювали поглинання зразків при довжині хвилі 562 нм. Результати представлено як пригнічення формування комплексу Феррозин-Fe²⁺.

Активність супероксиддисмутази (СОД) у ЕПЛ визначали за її здатністю пригнічувати реакцію аутоокислення адреналіну в лужному середовищі [19]. Швидкість реакції оцінювали спектрофотометричним методом за величиною оптичної щільності накопиченого продукту аутоокислення адреналіну за присутності дослідного зразка відносно контрольної проби (без дослідного препарату) при довжині хвилі 347 нм.

Здатність ЕПЛ видаляти Н₂О₂ оцінювали за реакцією перекису водню з молібдатом амонію, в результаті якої утворюється стійкий забарвлений комплекс. Реакцію ініціювали додаванням 0,1 мл зразка до 2 мл розчину перекису водню (0,03%) і зупиняли через 10 хв додаванням 1 мл молібдату амонію (4%). Інтенсивність поглинання вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм відносно контрольної проби, в якій замість досліджуваного зразка була вода [10]. Результати представлено як співвідношення активності до концентрації білка в зразках.

Для статистичної обробки результатів застосували пакет «Statgraphics Plus version 2.1 for Windows» («Manugistic», США). Всі вимірювання антиоксидантних параметрів для кожного зразка виконувалися тричі. Дані представляли як середнє для всіх досліджених плацент ± стандартне відхилення, аналізували за допомогою парного t-тесту з метою виявлення різниці між екстрактами, отриманими у різний спосіб. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Для оцінки антиоксидантної активності досліджуваних зразків використовували комплексний підхід, який дозволяє врахувати внесок антиоксидантних центрів різного походження.

1. Неферментативні антиоксидантні властивості ЕПЛ. Фенольні сполуки (вітамін Е, убіхінони, триптофан, тирозин, фенілаланін) можуть безпосередньо вносити вклад у антиоксидантну дію як «перехоплювачі» вільних радикалів [12, 34]. Загальний вміст фенолів у екстрактах, отриманих як шляхом 12-годинної експозиції, так й ультразвуку, зі свіжоотриманих та криоконсервованих плацент значуще не відрізнявся (табл. 1).

Отримані дані для екстрактів співпадають із показниками їх окремих фракцій. Статистично значущою відмінності між вмістом фенолів у окремих

stopped in 10 min by adding ammonium molybdate (4%). Intensity of absorbance was measured spectrophotometrically at 410 nm against the control, in which experimental sample was replaced by water [8]. The results are presented as activity vs. protein concentration ratio.

Statistical analysis was carried out using Statgraphics Plus version 2.1 for Windows (Manugistic, USA). All the values of antioxidant activity for each placenta were analyzed in triplicate set. The data were presented as mean for all examined placentas ± standard deviation and analyzed by paired t-test to find out a difference between sample means. Values with $P < 0.05$ were considered significant.

Results and discussion

A combined approach was chosen in order to evaluate antioxidant activity of experimental samples in order to estimate the contribution of different antioxidant centers.

1. HPE non-enzymatic antioxidant properties. Phenolic compounds (vitamin E, ubichinons, tryptophan, tyrosin, phenylalanine) may contribute directly to antioxidative action by scavenging free radicals [10, 34]. The values of total phenolic content in the extracts obtained either by 12-hr-long exposure or using ultrasound derived both from fresh and cryopreserved placentas did not differ significantly (Table 1).

Data obtained for extracts match with those for their individual fractions. There was no significant difference between phenols content values in individual fractions in all the experimental samples (Fig. 1).

Reducing power, stipulated with the substance ability to donate electrons, appears to be one of the main antioxidant characteristics of bioactive substances. One of the methods for reducing activity assessment is based on analyzing substance capacity to reduce

Таблиця 1. Загальний вміст фенольних сполук у ЕПЛ
Table 1. Total phenolic compounds content in HPE

Зразок ЕПЛ HPE sample	Загальний вміст фенолів, екв. мМ галової кислоти Total phenolic compounds content, eq. mM of galic acid
ЕПЛ _с HPE _f	0,78 ± 0,60
ЕПЛ _{с+уз} HPE _{f+us}	0,58 ± 0,33
ЕПЛ _{кд} HPE _с	0,70 ± 0,42
ЕПЛ _{кд+уз} HPE _{с+us}	0,61 ± 0,31

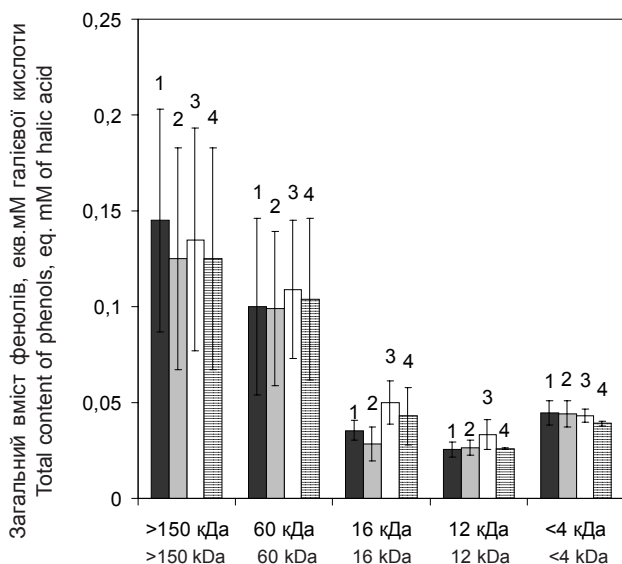


Рис. 1. Вплив криоконсервування та ультразвукових коливань на вміст фенольних сполук в окремих фракціях із ЕПЛ_{св} (1); ЕПЛ_{св+уз} (2); ЕПЛ_{кр} (3); ЕПЛ_{кр+уз} (4).

Fig. 1. Effect of cryopreservation and ultrasound treatment on total phenolic compound content in individual fractions of HPE_f (1); HPE_{f+us} (2); HPE_c (3); HPE_{c+us} (4).

фракціях досліджуваних зразків не спостерігалось (рис. 1).

Важливим параметром оцінки антиоксидантних властивостей біологічних речовин є їх відновлювальна активність, обумовлена їх здатністю бути донорами електронів. Один із методів оцінки такої активності пов'язаний із властивістю речовин відновлювати тривалентне залізо. Відомо, що антиоксиданти, активність яких можна оцінити цим методом, – це речовини з низькими молекулярними масами (сечова та аскорбінова кислота, фенольні сполуки і т. п.) та високим окислювально-відновлювальним потенціалом [5]. Низькотемпературне зберігання зменшувало дану активність незалежно від способу отримання екстракту (ЕПЛ_{св} > ЕПЛ_{кр}, $p = 0,04$; ЕПЛ_{св+уз} > ЕПЛ_{кр+уз}, $p = 0,0003$). Обробка гомогенатів плаценти ультразвуковими хвилями не призводила до статистично значущої відмінності залізовідновлювальної активності екстрактів порівняно з 12-годинною експозицією (рис. 2). Аналіз фракцій ЕПЛ, отриманих після застосування ультразвуку, показав статистично значущі зміни залізовідновлювальної активності лише у фракціях із м. м. >150 кДа (рис. 3).

Однією з основних ланок антиоксидантного захисту біологічних макромолекул у внутрішньоклітинному середовищі є хелатні сполуки, які зв'язують іони металів змінної валентності та запобігають тим самим їх участі у реакції розкладання перекису з утворенням гідроксильного радикала [8].

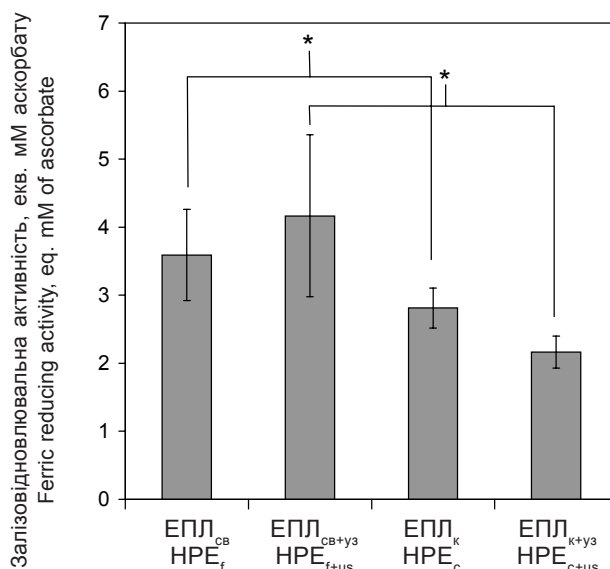


Рис. 2. Залізовідновлювальна активність ЕПЛ; * – значущі відмінності ($p < 0,05$).

Fig. 2. HPE ferric reducing activity; * – significant difference ($p < 0.05$).

ferric ion. Antioxidants which assessed by this method are known to be mainly the substances of low-molecular masses (uric acid, ascorbic acid, phenolic compounds, etc.) and to possess a high redox potential [2]. Low temperature storage has resulted in lowering of such an ability regardless of the way of extract obtaining (HPE_f > HPE_c, $p = 0,04$; HPE_{f+us} > HPE_{c+us},

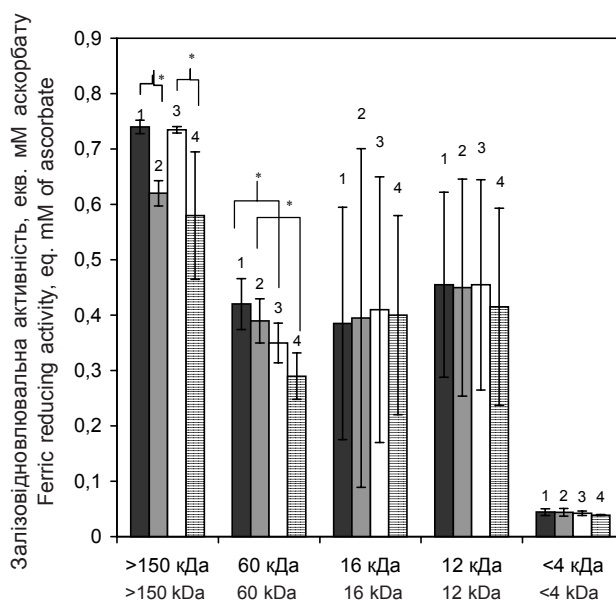


Рис. 3. Залізовідновлювальна активність окремих фракцій із ЕПЛ_{св} (1); ЕПЛ_{св+уз} (2); ЕПЛ_{кр} (3); ЕПЛ_{кр+уз} (4); * – значущі відмінності ($p < 0,05$).

Fig. 3. Ferric reducing activity of individual fractions of HPE_f (1); HPE_{f+us} (2); HPE_c (3); HPE_{c+us} (4); * – significant differences ($p < 0.05$).



Показано, що всі експериментальні зразки не виявили хелатуючої активності. Раніше нами було встановлено, що екстракти, отримані з плацент строком гестації 40 тижнів, на відміну від плацент зі строком гестації 38 тижнів (запланований кесарів розтин) не характеризуються хелатуючою активністю, що може бути пов'язано з накопиченням вільних радикалів у плаценті протягом вагітності [25]. Таким чином, зміна способу отримання екстрактів не впливала на даний показник, що, на наш погляд, обумовлено якістю та властивостями самої плаценти.

Відомо, що $ABTS^+$ -радикал здатний вступати до реакцій із більшістю антиоксидантів, у тому числі з тіолами, аскорбіною кислотою, сечовою кислотою, фенолами. У результаті такої реакції блакитний $ABTS^+$ -радикал знову перетворюється на знебарвлену нейтральну форму [31, 32].

Раніше нами було показано, що кінетики відновлення $ABTS^+$ -радикала екстрактами з плацент 40 тижнів гестації, отриманими шляхом 12-годинної експозиції з фізіологічним розчином, мають перехід із мінімумом у поглинанні при 10 с та подальшим частковим відновленням поглинання радикала (рис. 4) [25]. При цьому у деяких випадках спостерігається повна втрата екстрактами активності повільних центрів (рис. 4). Такий перехід ми пов'язуємо з протіканням оборотних перехресних реакцій. Застосування ультразвукових коливань не впливало на цей ефект.

Враховуючи, що в усіх випадках кінетика нейтралізації $ABTS^+$ -радикала включає дві фази, було

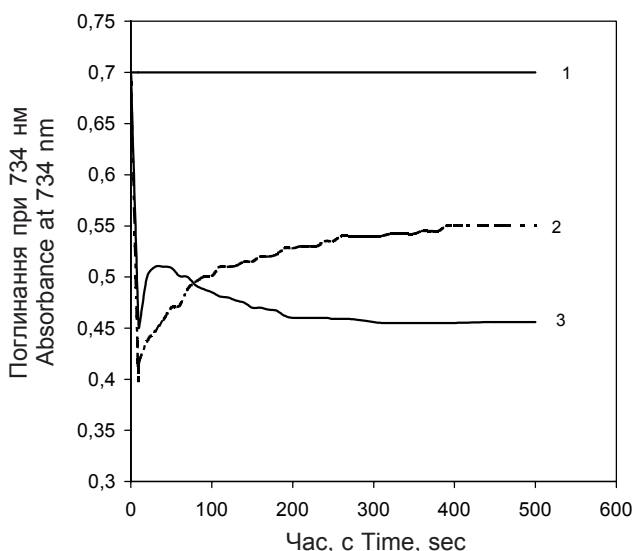


Рис. 4. Приклади кінетик відновлення $ABTS^+$ -радикала ЕПЛ_{св}: 1 – початковий розчин $ABTS^+$ -радикала; 2, 3 – ЕПЛ_{св}.

Fig. 4. Typical kinetics of $ABTS^+$ -radical reduction by HPE_r: 1 – initial $ABTS^+$ radical solution; 2, 3 – HPE_r.

$p = 0,0003$). Treatment of placenta homogenate with ultrasonic waves did not lead to the statistically significant difference in ferric reducing activity comparing with 12-hr-long exposure (Fig. 2). Analysis of HPE fraction, obtained after ultrasound treatment, showed the statistically significant differences in ferric reducing activity only in the fractions with m.m. > 150 kDa (Fig. 3).

One of the main antioxidant protection mechanisms of biological macromolecules in extracellular medium is provided by chelating compounds, binding transition metal ions and preventing their participation in peroxide decomposition reactions with production of hydroxyl radicals [5].

All the experimental samples did not manifest a chelating ability. Previously it has been revealed that extracts derived from placentas at 40 weeks of gestation did not possess such activity in comparison with those of 38 weeks (scheduled Cesarean section). This fact may be associated with free radical accumulation in placenta during pregnancy [25]. Thus the change of extract obtaining technique did not affect their chelating ability, we suppose it to be stipulated with the placenta quality.

The $ABTS^+$ radical is known to react with most antioxidants including thiols, ascorbic acid, uric acid, phenolics. During this reaction, the blue colored $ABTS^+$ radical is converted back to its colorless neutral form [31, 32].

Previously we have shown that profile of kinetic of $ABTS^+$ radical reduction by the extracts derived from placentae of 40 weeks of gestation obtained by 12-hr-long exposure has an overshooting with a minimum in absorbance at 10 sec followed by a partial recovery of the radical absorbance (Fig. 4) [25]. Moreover, in some cases the severe loss of slow scavenging centers activity was indicated (Fig. 4). The observed overshooting may be explained with the occurrence of reversible cross-combination reactions. Ultrasound application did not influence the phenomenon.

Taking into account that in all the cases the $ABTS^+$ neutralization kinetic included two phases, the activity of both rapid and slow reducing centers have been assessed. The activity values for slow reducing $ABTS^+$ radical centers did not differ significantly for HPEs obtained in different ways. Here, the application of ultrasound for obtaining the extracts have resulted in lowering of both activity of rapid reducing $ABTS^+$ radical centers and total antiradical activity (Table 2).

It has been established that the most HPE fractions possessed antiradical activity, they contained both rapid and slow reducing centers (Fig. 5, 6). The character of antiradical activity alterations of rapid reducing centers differed depending on fractions (Fig. 5). The results obtained for individual fractions concerning

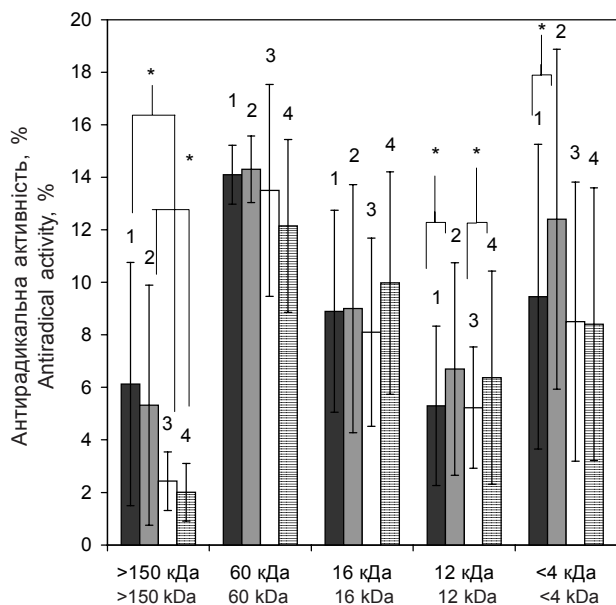


Рис. 5. Антирадикальна активність швидковідновлювальних центрів окремих фракцій із ЕПЛ_{св} (1); ЕПЛ_{св+уз} (2); ЕПЛ_{кр} (3); ЕПЛ_{кр+уз} (4); * – значущі відмінності ($p < 0,05$).

Fig. 5. Antiradical activity of rapid reducing centers of individual fractions of HPE_f (1); HPE_{f+us} (2); HPE_c (3); HPE_{c+us} (4); * – significant differences ($p < 0.05$).

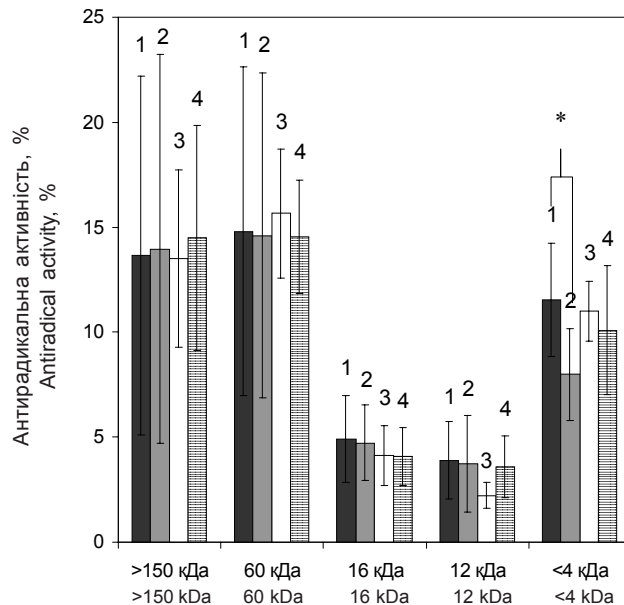


Рис. 6. Антирадикальна активність повільновідновлювальних центрів окремих фракцій із ЕПЛ_{св} (1); ЕПЛ_{св+уз} (2); ЕПЛ_{кр} (3); ЕПЛ_{кр+уз} (4); * – значущі відмінності ($p < 0,05$).

Fig. 6. Antiradical activity of slow reducing centers of individual fractions of HPE_f (1); HPE_{f+us} (2); HPE_c (3); HPE_{c+us} (4); * – significant differences ($p < 0.05$).

проведено оцінку активності як швидко-, так і повільновідновлювальних центрів. Значення активності повільновідновлювальних АВТS⁺-радикал центрів значуще не відрізняються для ЕПЛ, отриманих у різний спосіб. При цьому застосування ультразвуку для одержання екстрактів призводило до статистично менших значень активності швидковідновлювальних АВТS⁺-радикал – центрів та загальної антирадикальної активності (табл. 2).

Встановлено, що для більшості фракцій ЕПЛ властива антирадикальна активність, вони містять як швидко-, так і повільновідновлювальні центри (рис. 5, 6). Характер змін антирадикальної активності швидковідновлювальних центрів у різних фракціях був неоднаковий (див. рис. 5). Результати, отримані для окремих фракцій стосовно активності повільновідновлювальних центрів, узгоджуються з даними для екстрактів. Статистично значущих змін цього показника у фракціях не виявлено, значуще відрізнялися лише значення цього показника у фракції < 4 кДа з ЕПЛ_{св+уз} порівняно з ЕПЛ_{св} (див. рис. 6).

activity of slow reducing centers match with the data for whole extracts. There were no statistical significant changes of this parameter in fractions, except for the HPE_{f+us} fraction with m. m. < 4 kDa in comparison with HPE_f (Fig. 6).

Таблиця 2. Антирадикальна активність екстрактів, отриманих зі свіжої та криоконсервованої плаценти шляхом експозиції з фізіологічним розчином або дії ультразвукових коливань

Table 2. Antiradical activity of extracts from fresh and cryopreserved placenta obtained with physiological solution or ultrasound treatment

Зразок ЕПЛ HPE sample	Активність швидко- відновлювальних центрів, % Activity of rapid reducing centers, %	Активність повільно- відновлювальних центрів, % Activity of slow reducing centers, %	Загальна антирадикальна активність, % Total antiradical activity, %
ЕПЛ _с HPE _f	38,10 ± 6,17	25,45 ± 8,51	63,55 ± 13,66
ЕПЛ _{с+уз} HPE _{f+us}	28,58 ± 9,49*	28,58 ± 10,64	57,18 ± 15,22*
ЕПЛ _{кр} HPE _c	38,20 ± 15,38	28,93 ± 12,8	63,13 ± 16,26
ЕПЛ _{кр+уз} HPE _{c+us}	23,28 ± 8,19 [#]	29,05 ± 11,65	52,33 ± 18,32 [#]

Примітка: * # – статистично значущі відмінності порівняно з ЕПЛ_{св} та ЕПЛ_{кр} відповідно, $p \leq 0,05$.

Note: * # – statistically significant differences in comparison with HPE_f and HPE_c correspondingly, $p \leq 0.05$.



Таблиця 3. Супероксиддисмутазна активність (од./хв на мг білка) ЕПЛ та фракції з м.м ~130 кДа

Table 3. Superoxide dismutase activity (unit/min per mg of protein) in HPE and fraction with mm ~130 kDa

Зразок ЕПЛ HPE sample	Загальний екстракт Total extract	Фракція ~ 130 кДа Fraction of ~ 130 kDa
ЕПЛ _c HPE _f	3,61 ± 0,42	3,42 ± 0,49
ЕПЛ _{c+уз} HPE _{f+us}	3,19 ± 0,29	3,30 ± 0,29
ЕПЛ _{кр} HPE _c	3,11 ± 0,61	3,43 ± 0,53
ЕПЛ _{кр+уз} HPE _{c+us}	3,86 ± 1,02	2,74 ± 0,78

2. *Ферментативна антиоксидантна активність ЕПЛ.* Відомо, що основною ланкою антиоксидантного захисту у внутрішньоклітинному середовищі є ферментативні антиоксиданти, які мають високу специфічність дії, зокрема СОД і каталаза. За величиною активності СОД (разом із каталазою, яка інактивує вже продукт дії СОД – H₂O₂) можна зробити висновок про антиоксидантний статус екстрактів, тканини або організму в цілому. Величина активності СОД характеризує її здатність утилізувати супероксидні радикали [16, 33].

Метод, який застосовували у роботі, дозволяє визначити сумарну активність СОД зразка. Значення активності СОД для всіх досліджених ЕПЛ не мали значущої різниці (табл. 3). Результати вивчення активності СОД у різних фракціях, отриманих методом гель-хроматографії, показали, що найбільший вклад у сумарну активність вносить позаклітинна СОД-3 (м. м. 132 кДа).

Відомо, що однією з основних функцій каталази є знешкодження пероксиду водню [16]. Аналізуючи показники каталазної активності, було встановлено, що значущо нижчі значення каталазної активності спостерігалися лише у разі отримання екстрактів зі свіжовиділеної плаценти при застосуванні ультразвукових коливань порівняно з ЕПЛ_{cb} (табл. 4). Значення каталазної активності для фракції > 150 кДа з усіх досліджених ЕПЛ відповідають даним, отриманим для цільного екстракту.

Таким чином, низькотемпературне зберігання плаценти не призводило до значних змін антиоксидантних показників ЕПЛ, а зменшення залізовідновлювальної активності цільних екстрактів може бути пов'язано з криодеструкцією низькомолекулярних антиоксидантів у процесі зберігання.

Відомо, що ультразвук виявляє ефект стерилізації, що є дуже важливим при отриманні фармацев-

2. *HPE enzymatic activity.* Enzymatic antioxidants in particular SOD and catalase are known to have a high specificity of action and to be the main link of antioxidant protection in intracellular medium. Analyzing SOD activity (together with the one of catalase, which inactivates the product of SOD reaction – H₂O₂) the antioxidant status of extracts, tissue or the whole organism may be assessed. The SOD activity value characterizes its ability to utilize a superoxide radical [16, 33].

The method which has been used in the research allows determining total SOD activity of the sample. SOD activity values for all the examined HPE did not differ significantly (Table 3). Studying SOD activity in different fractions, obtained using gel-chromatography method, have revealed the major contribution of extracellular SOD-3 (m. m. 132 kDa).

The main catalase function is known to be hydrogen peroxide decomposition [16]. The analysis of catalase activity have indicated the significantly lower values of such an activity for the extracts obtained from fresh placenta with ultrasound treatment in comparison with HPE_f (Table 4).

Thus placenta low temperature storage did not lead to significant changes of HPE antioxidant properties. Also lowering of ferric reducing activity of the extracts might be associated with cryodestruction of low molecular mass antioxidants during storage.

Ultrasound is known to provide a sterilizing effect, which is very important when obtaining pharmaceuticals. Previously it has been shown that in some cases ultrasound can improve the extraction of intracellular substances from plant material and increase antioxidant activity of samples. Moreover, such parameters as vibration frequency and duration of ultrasonic treatment is of great importance. This effect may be

Таблиця 4. Каталазна активність (мкМ/хв на мг білка) ЕПЛ
Table 4. Catalase activity (µM/min per mg of protein) of HPE

Зразок ЕПЛ HPE sample	Каталазна активність Catalase activity
ЕПЛ _c HPE _f	3,13 ± 0,03
ЕПЛ _{c+уз} HPE _{f+us}	2,42 ± 0,24*
ЕПЛ _{кр} HPE _c	3,4 ± 0,4
ЕПЛ _{кр+уз} HPE _{c+us}	3,77 ± 0,7

Примітка: * – статистично значущі відмінності порівняно з ЕПЛ_{cb}, $p \leq 0,05$.

Note: * – statistically significant differences in comparison with HPE_f, $p \leq 0.05$.

тичних препаратів. Раніше було показано, що у деяких випадках ультразвук може покращувати екстракцію внутрішньоклітинних речовин із рослинних матеріалів та підвищувати антиоксидантну активність отриманих за його допомогою зразків. При цьому великого значення набувають такі параметри, як частота коливань та час обробки ультразвуковими хвилями. Можливо, що такий ефект пов'язаний із феноменом кавітації [7, 9], яка у водних розчинах спричиняє генерацію атомів водню та гідроксильного радикала, які можуть рекомбінувати з утворенням водню та пероксиду водню або реагувати з речовинами у газовій фазі на межі газ-рідина або у об'ємі розчину [23, 24]. Беручи до уваги вищезазначені факти, можна припустити, що незначне зниження неферментативної антиоксидантної та каталазної активності ЕПЛ та їх фракцій при застосуванні ультразвукових коливань може бути обумовлене утворенням вільних радикалів із подальшою їх нейтралізацією антиоксидантами плаценти. Однак слід зазначити, що антиоксидантна активність у таких екстрактах залишається на високому рівні. Результати дослідження фракції з м. м. 12 кДа (ЕПЛ_{св} та ЕПЛ_{кр+уз}) щодо збереження всіх вивчених антиоксидантних параметрів і підвищення антирадикальної активності швидкодіювальних АВТS⁺-радикал – центрів є дуже вагомими. Раніше нами було показано, що саме ця фракція найбільш ефективна у попередженні оксидативного стресу еритроцитів, викликаного нітритом натрію [26].

Висновки

Встановлено, що зберігання плаценти при -196°C протягом 6 місяців не приводило до значних змін антиоксидантної активності ЕПЛ. При порівнянні двох способів отримання екстрактів встановлено, що ультразвукові коливання є ефективними для збереження як неферментативних, так і ферментативних антиоксидантних властивостей екстрактів. Незначне зниження антиоксидантної активності екстрактів, отриманих із застосуванням ультразвуку, а також їх фракцій, може бути пов'язане з утворенням вільних радикалів або недостатнім часом екстрагування при використанні ультразвуку.

Література

1. Акопян Б.В., Ершов Ю.А. Ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии. – М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. – 224 с.
2. Герасимов Д.В., Сучкова Е.П. Теоретические основы применения ультразвука для обработки пищевых систем с целью регулирования содержания биологически активных компонентов // Науч. журнал НИУ ИТМО. Серия

related to the cavitation phenomenon [4, 7], causing the generation of hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solutions, which in their turn can either recombine to form hydrogen and hydrogen peroxide or react with substances in the gas phase on the gas-liquid interface or in the solution bulk [23, 24]. Taking into account all above said it can be assumed that a slight decrease both of non-enzymatic antioxidant activity and catalase activity of HPE and their fractions after ultrasound treatment may be associated with the generation of free radicals with their following deactivation by placenta antioxidants. However, it should be mentioned that antioxidant activity in this extracts is kept at high level. The results of the studying the fraction of 12 kDa (HPE_f and HPE_{c+us}) concerning preservation of all the studied antioxidant properties and increase of antiradical activity of rapid reducing АВТS⁺ radical centers is of great importance. We have previously shown that this fraction was the most effective in preventing nitrite-induced oxidative stress in erythrocytes [26].

Conclusions

Placenta storage at -196°C during 6 months did not lead to significant changes in HPE antioxidant activity. When comparing two methods of extracts obtaining it has been shown that an ultrasound treatment has been shown to be effective when preserving both non-enzymatic and enzymatic antioxidant properties of the extracts. The slight decrease in extracts antioxidant activity obtained using ultrasound as well as their fractions may be associated either with the free radicals generation or insufficient extraction time during ultrasound treatment.

References

1. Akopian V.B., Ershov Iu. A. Ultrasound in medicine, veterinary medicine and experimental biology. Moscow: Izd-vo MG TU im. N.E. Bauman; 2005.
2. Benzie I. F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239 (1): 70–76.
3. Dinis T.C.P., Madeira V.M.C., Almeida L.M. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys* 1994; 315 (1): 161–169.
4. Fahmi R., Khodaiyan F., Pourahmad R. Effect of ultrasound assisted extraction upon the protein content and rheological properties of the resultant soymilk. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2011; 3 (4): 245–249.
5. Flora S.J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloids exposure. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2 (4): 191–206.
6. Gerasimov D.V., Suchkova E.P. Theoretical basics of employment ultrasound for food systems processing in order to regulate the content of bioactive components. *Scientific*



- «Процессы и аппараты пищевых производств». – 2014. – №2. – С. 52–60.
3. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства и перспективы клинического применения / Под ред. В.И. Грищенко, Т. Н. Юрченко. – Харьков, 2011. – 268 с.
 4. Хмелев В.Н., Сливин А.Н., Барсуков Р.В. и др. Применение ультразвука высокой интенсивности в промышленности. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2010. – 203 с.
 5. Benzie I. F., Strain J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay // *Anal Biochem.* – 1996. – Vol. 239, №1. – P. 70–76.
 6. Dinis T.C.P., Madeira V.M.C., Almeida L.M. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – Vol. 315, №1. – P. 161–169.
 7. Fahmi R., Khodaiyan F., Pourahmad R. Effect of ultrasound assisted extraction upon the protein content and rheological properties of the resultant soymilk // *Advance Journal of Food Science and Technology.* – 2011. – Vol. 3, №4. – P. 245–249.
 8. Flora S.J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2009. – Vol. 2, №4. – P. 191–206.
 9. Golmohamadi A., Moller G., Powers J. Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree // *Ultrason. Sonochem.* – 2013. – Vol. 20, №5. – P. 1316–1323.
 10. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // *Clin. Chim. Acta.* – 1991. – Vol. 196, №2–3. – P. 143–151.
 11. Harris D.A. Spectrophotometric assays // *Spectrophotometry & spectrofluorimetry.* – Washington: IRL Press, 1987. – P. 49–90.
 12. Henriquez C., Aliaga C., Lissi E. Kinetics profiles in the reaction of ABTS derived radicals with simple phenols and polyphenols // *J. Chil. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 49, №1. – P. 74–76.
 13. Isachenko V., Isachenko E., Reinsberget J. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of rapid and conventional freezing // *Cryobiology.* – 2007. – Vol. 55, №3. – P. 261–68.
 14. Lai J., Xin C., Zhao Y. et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of antioxidants from black soybean (*Glycine max var*) sprouts using response surface methodology // *Molecules.* – 2013. – Vol. 18, №1. – P. 1101–1110.
 15. Lee K.H., Kim, T.H., Lee W.C. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of human placenta extract // *Nat. Prod. Res.* – 2011. – Vol. 25, №11. – P. 1090–1100.
 16. Mates J. M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases // *Clin Biochem.* – 1999. – Vol. 32, №8. – P. 595–603.
 17. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta // *Histochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 122, №4. – P. 369–382.
 18. Nardid O.A., Pogozykh D.N., Repina S.V. Influence of low temperature storage on the properties of human placenta extracts // *J. Exp. Integr. Med.* – 2012. – Vol. 2, №3. – P. 213–217.
 19. Otitoju O., Onwurah I., Otitoju G. Oxidative stress and superoxide dismutase activity in brain of rats fed with diet containing permethrin // *Biokemistri.* – 2011. – Vol. 20, №2. – P. 93–98.
 20. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine // *Jpn. J. Nutr.* – 1986. – Vol. 44. – P. 307–315.
 21. Park S.Y., Phark S., Lee M. et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of placental extracts in benzo[a] pyrene-exposed rats // *Placenta.* – 2010. – Vol. 31, №10. – P. 873–879.
 22. Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay // *Free Radical Biology and Medicine.* – 1999. – Vol. 26, № 9–10. – P. 1231–1237.
 23. journal NRU ITMO. Series "Processes and equipment for food production" 2014; (2): 52–60.
 24. Golmohamadi A., Moller G., Powers J. Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrason Sonochem* 2013; 20 (5): 1316–1323.
 25. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196 (2–3): 143–151.
 26. Gryschenko V.I., Yurchenko T.N., editors. Placenta: cryopreservation, structure, properties and perspectives of clinical application. Kharkiv; 2011.
 27. Harris D. A. Spectrophotometric assays. In: *Spectrophotometry & spectrofluorimetry.* Washington: IRL Press; 1987.
 28. Henriquez C., Aliaga C., Lissi E. Kinetics profiles in the reaction of ABTS derived radicals with simple phenols and polyphenols. *J Chil Chem Soc* 2004; 49 (1): 74–76.
 29. Hmelev V.N., Slivin A.N., Barsukov R.V. et al. Application of ultrasound of high intensity in the industry. Bysk: Altai State Technical University; 2010.
 30. Isachenko V., Isachenko E., Reinsberget J. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology* 2007; 55 (3): 261–268.
 31. Lai J., Xin C., Zhao Y. et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of antioxidants from black soybean (*Glycine max var*) sprouts using response surface methodology. *Molecules* 2013; 18 (1): 1101–1110.
 32. Lee K.H., Kim, T.H., Lee W.C. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of human placenta extract. *Nat Prod Res* 2011; 25 (11): 1090–1100.
 33. Mates J. M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32 (8): 595–603.
 34. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004; 122 (4): 369–382.
 35. Nardid O. A., Pogozykh D. N., Repina S. V. Influence of low temperature storage on the properties of human placenta extracts. *J Exp Integr Med* 2012; 2 (3): 213–217.
 36. Otitoju O., Onwurah I., Otitoju G. Oxidative stress and superoxide dismutase activity in brain of rats fed with diet containing permethrin. *Biokemistri* 2011; 20 (2): 93–98.
 37. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr* 1986; 44: 307–315.
 38. Park S.Y., Phark S., Lee M. et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of placental extracts in benzo[a] pyrene-exposed rats. *Placenta* 2010; 31 (10): 873–879.
 39. Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 26 (9–10): 1231–1237.
 40. Riesz P., Berdahl D., Christman C. L. Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 233–252.
 41. Riesz P. Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radic Biol Med* 1992; 13 (3): 247–270.
 42. Rozanova S. Antioxidant properties of extracts derived from placenta of different gestation terms. *Oxid Antioxid Med Sci* 2014; 3 (3): 181–186.
 43. Rozanova S., Cherkashina Y., Repina S. Protective effect of placenta extracts against nitrite-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2012; 17(2): 240–248.
 44. Shinde V., Dhalwal K., Paradar A.R. et al. Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract. *Pharmacology online* 2006; 3: 172–179.
 45. Singleton V., Orthofer L. R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999; 299: 152–177.

23. Riesz P., Berdahl D., Christman C.L. Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions // *Environ. Health Perspect.* – 1985. – Vol. 64. – P. 233–252.
24. Riesz P., Kondo T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications // *Free Radic. Biol. Med.* – 1992. – Vol. 13, №3. – P. 247–270.
25. Rozanova S. Antioxidant properties of extracts derived from placentae of different gestation terms // *Oxid. Antioxid. Med. Sci.* – 2014. – Vol. 3, №3. – P. 181–186.
26. Rozanova S., Cherkashina Y., Repina S. Protective effect of placenta extracts against nitrite-induced oxidative stress in human erythrocytes // *Cellular & Molecular Biology Letters.* – 2012. – Vol. 17, №2. – P. 240–248.
27. Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R. et al. Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract // *Pharmacology online.* – 2006. – Vol. 3. – P. 172–179.
28. Singleton V., Orthofer L.R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods Enzymol.* – 1999. – Vol. 299. – P. 152–177.
29. Stanic-Vucinic D., Prodic I., Apostolovic D. et al. Structure and antioxidant activity of β -lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions // *Food Chem.* – 2013. – Vol. 138, №1. – P. 590–599.
30. Togashi S., Takahashi N., Iwama M. et al. Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract // *Placenta.* – 2002. – Vol. 23, №6. – P. 497–502.
31. Van den Berg R., Haenen G.R.M., Van den Berg H. et al. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures // *Food Chem.* – 1999. – Vol. 66, №4. – P. 511–517.
32. Walker R.B., Everette J.D. Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – Vol. 57, №4. – P. 1156–1161.
33. Yahia D.A., Madani S., Prost E. Tissue antioxidant status differs in spontaneously hypertensive rats fed fish protein or casein // *J. Nutr.* – 2003. – Vol. 133, №2. – P. 479–482.
34. Zhou Y.C., Zheng R.L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants // *Biochem. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 42, №6. – P. 1177–1179.
29. Stanic-Vucinic D., Prodic I., Apostolovic D. et al. Structure and antioxidant activity of β -lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions. *Food Chem* 2013; 138 (1): 590–599.
30. Togashi S., Takahashi N., Iwama M. et al. Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract. *Placenta* 2002; 23 (6): 497–502.
31. Van den Berg R., Haenen G.R.M., Van den Berg H. et al. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem* 1999; 66 (4): 511–517.
32. Walker R.B., Everette J.D. Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *J Agric Food Chem* 2009; 57 (4): 1156–1161.
33. Yahia D.A., Madani S., Prost E. Tissue antioxidant status differs in spontaneously hypertensive rats fed fish protein or casein. *J Nutr* 2003; 133 (2): 479–482.
34. Zhou Y.C., Zheng R.L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem Pharmacol* 1991; 42 (6): 1177–1179.

